

玫烟色棒束孢诱导的小菜蛾免疫响应表达谱分析

雷妍圆¹, 何余容^{2,*}, 谢梅琼³, 吕利华¹, 顾家睿²

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;

2. 华南农业大学农学院, 广州 510642; 3. 惠州学院, 广东惠州 516007)

摘要:【目的】本研究旨在筛选小菜蛾 *Plutella xylostella* 应对玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 侵染的免疫应答及其网络调控基因, 以进一步探讨小菜蛾对玫烟色棒束孢的防御机制。【方法】采用第二代高通量测序技术 RNA-seq, 对处理后 12 h 的感染玫烟色棒束孢和健康(平行对照)的小菜蛾 4 龄幼虫转录组进行了测序, 通过生物信息学分析对得到的差异基因进行了功能注释和分类, 对差异基因参与的信号通路进行了分析。【结果】在感菌和健康小菜蛾幼虫转录组两个表达谱里, 分别获得了 12 346 987 和 12 315 210 个 clean reads, 有 60.93% 和 61.26% 的 reads 分别能比对到参考基因库里, 其中完美匹配(perfect match)的比例分别为 32.15% 和 32.73%。共得到 351 个显著差异表达基因(differentially expressed unigenes, DEUs), 上调表达基因有 275 个, 下调表达基因有 76 个, 与免疫防御反应潜在相关的基因有 156 个。GO (Gene Ontology) 富集分析有 102 个 DEUs 分布到 46 个 GO term 里, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway 富集分析结果显示, 有 132 个 DEUs 显著富集在 13 个代谢通路(pathway)里。【结论】这些差异表达基因中, 大部分编码潜在的与免疫识别及调控相关的基因, 集中在能量代谢、疾病反应和防御反应等相关通路。研究结果为挖掘与玫烟色棒束孢侵染相关的小菜蛾免疫应答候选基因提供了重要数据库, 也为阐明小菜蛾对玫烟色棒束孢的免疫机制奠定理论基础。

关键词: 小菜蛾; 玫烟色棒束孢; 免疫应答; 转录组; RNA-seq; 表达谱; 生物信息学

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)09-0956-09

Transcriptome analysis of immune responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) infected by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*

LEI Yan-Yuan¹, HE Yu-Rong^{2,*}, XIE Mei-Qiong³, LÜ Li-Hua¹, GU Jia-Rui² (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 3. Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to explore the immune-related genes and immune recognition regulatory network of *Plutella xylostella* against the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*, so to further investigate the innate immune mechanisms of *P. xylostella* to *I. fumosorosea*. 【Methods】 We analyzed the transcriptome of *I. fumosorosea*-infected and uninfected (the control) 4th instar larvae of *P. xylostella* at 12 h after treatment using high-throughput single-end RNA-sequencing (RNA-seq). The differentially expressed genes and their functions, classifications and signaling pathways were analyzed using bioinformatic tools. 【Results】 The numbers of 12 346 987 and 12 315 210 clean reads were obtained

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31401743); 广东省农业科学院院长基金项目(201426)

作者简介: 雷妍圆, 女, 1981 年 9 月生, 广西南宁人, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫生物信息学及分子生物学, E-mail: leiyanyuan@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yrhe@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-06-19; 接受日期 Accepted: 2016-08-29

for the infected and uninfected libraries, respectively. Among the two RNA-seq libraries, 60.93% and 61.26% of reads could be mapped to reference genome with a perfect match proportion of 32.15% and 32.73%, respectively. A total of 351 differentially expressed unigenes (DEUs) were identified between infected and uninfected larvae. Among them, 275 DEUs were up-regulated while 76 DEUs down-regulated. In total, there were 156 DEUs putatively involved in immune responses. A Blast2GO analysis indicated that 102 differentially expressed transcripts were able to be assigned to 46 Gene Ontology (GO) terms. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis mapped 132 DEUs to 13 pathways ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Most of the DEUs are putatively linked to innate immune recognition and regulation. These infection-responsive DEUs are enriched in various immune processes, such as energy metabolism, disease and defense response. The findings generated from this study provide a bioinformatic database for searching immune-related genes, and also benefit the future investigations of the innate immune mechanisms of *P. xylostella* against the entomopathogenic fungus *I. fumosorosea*.

Key words: *Plutella xylostella*; *Isaria fumosorosea*; immune response; transcriptome; RNA-seq; expression profile; bioinformatics

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是一种为害十字花科蔬菜的世界性农业害虫 (Talekar and Shelton, 1993), 目前对于防治其危害的各类化学杀虫剂都能较快产生抗性 (Mohan and Gujar, 2003; Baek *et al.*, 2005), 其亦是最早被发现在田间对 Bt 制剂产生抗性的害虫 (Heckel *et al.*, 1999), 研究新的防治途径, 利用昆虫病原真菌进行生物防治是持久高效控制小菜蛾为害的必然趋势 (邱德文, 2015; 雷仲仁等, 2016)。

玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 作为一类重要的生防真菌, 能寄生多种蔬菜和果树害虫 (陈巍巍和冯明光, 1999; Wraight *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2008; Marjorie *et al.*, 2010), 是继球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 之后最有开发潜力的昆虫病原真菌 (Milner, 1997; Wraight *et al.*, 2000)。利用玫烟色棒束孢控制虫害已得到广泛认同, 但目前国内仍未实现该菌的产业化生产和田间应用, 除了其发酵生产工艺和施用制剂还有待研发, 来自寄主昆虫体内的抵抗作用也成为了影响其防效的一个重要因素。本研究室曾报道一株高致病力玫烟色棒束孢 (吕利华等, 2007), 在 1×10^7 孢子/mL 浓度下对小菜蛾 2 龄幼虫的 LT_{50} 仅 1.72 d。我们对该菌株与小菜蛾的互作关系进行了较为系统的研究, 发现小菜蛾 4 龄幼虫感染 24 h 后, 虫体血细胞总数由正常的每 mm^3 血淋巴中 750 个大幅上升至最高值 6 250 个, 主要以具有免疫功能的浆血细胞和粒血细胞对菌丝段进行吞噬和囊包。面对虫体的免疫识别与防御, 菌体采取了增殖小型颗粒状菌丝段快速侵染的逃避策略, 昆虫与病原真菌之间存在着识别与反识别、免疫

与抗免疫的动态互作关系 (雷妍圆等, 2011)。

宿主免疫系统与昆虫病原真菌的作用是多方面的, 昆虫的生理防御基因在不同微生物诱导下的表达模式不同 (Wang *et al.*, 2010), 昆虫病原真菌进入虫体之后, 被昆虫的天然免疫受体即模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别, 开始免疫反应。虫体天然免疫系统对病原菌的抵抗, 是延缓病原真菌致病速度的主要原因。有研究表明, 人为抑制昆虫的免疫系统, 其生存将受到影响 (Magalhaes *et al.*, 2010)。找到免疫应答过程中的关键因子并以此为靶标, 筛选对这个关键因子有抑制、阻断等功能的基因, 对于高效杀虫微生物的筛选、改良和设计具有十分重要的应用价值。

目前小菜蛾对玫烟色棒束孢免疫受体基因及免疫调控网络关键基因的种类尚不清楚, 这些免疫相关基因的抗菌功能和互作关系网有待进一步的研究。为此, 本研究从生物信息学入手, 利用 RNA-seq 表达谱技术 (Wang *et al.*, 2009), 对感菌与健康小菜蛾进行表达谱测序和差异分析, 比较感菌与健康小菜蛾差异基因表达量的变化, 寻找与玫烟色棒束孢侵染相关的小菜蛾免疫应答候选基因, 为进一步探讨特异性表达差异基因与免疫的关系奠定信息学基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和真菌

本试验所用的小菜蛾来自于华南农业大学农学院天敌昆虫实验室, 为人工饲养多代的室内种群, 室内温度控制为 $(25 \pm 1)^\circ C$, 相对湿度 60% ~ 90%, 光周期 14L: 10D, 幼虫长至 4 龄初供试。玫烟色棒束

孢菌株 EBCL 03011 来源于台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* 染菌尸体(雷妍圆等, 2011), 菌种于华南农业大学昆虫生态室 -80°C 下保藏。菌株在萨氏培养基 SDAY(葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 10 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 蒸馏水 1 L) 平板上, 25°C , 无光照条件下培养 20 d, 用接种环将分生孢子粉刮至灭菌的 0.05% Tween-80 溶液中, 配制成浓度为 1×10^8 孢子/mL 的孢子悬浮液供试。

1.2 小菜蛾的免疫诱导及表达谱测序样品制备

用软毛笔挑选个体大小、活力一致的 4 龄幼虫, 分感菌和健康对照两部分处理。一部分用孢子悬浮液浸渍 10 s 后挑出, 另一部分用灭菌的 0.05% 吐温-80 溶液浸渍 10 s 处理, 分别将各处理的幼虫置于滤纸上, 吸去多余水分后移至新鲜甘蓝叶片上, 放入皿底垫有湿润滤纸片的培养皿(直径 = 9 cm)中, 培养皿用保鲜膜封口保湿, 封口处用针扎数孔以通风透气。幼虫接种后放在 25°C , 光周期 14L: 10D 的人工智能箱中饲养。收集感菌 12 h 的小菜蛾幼虫作为感菌样品, 平行收集 0.05% 吐温-80 溶液处理 12 h 的健康幼虫为对照样品(雷妍圆等, 2011)。将存有样品的离心管置于液氮中速冻, 然后保存于 -80°C 防止 RNA 降解。每个样品收集 7 ~ 8 头幼虫, 提取 RNA 用于测序。

1.3 RNA 抽提、cDNA 文库构建及 solexa 测序

按 Trizol 试剂抽提法提取总 RNA, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用 Agilent 2100 检测 RNA 的纯度。用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集含有 poly-A 的 mRNA, 然后通过 Fragmentation buffer 对富集到的 mRNA 进行片段化处理, 以随机打断成短片段的 mRNA 作为模板, 再通过六碱基的随机引物(random hexamers)合成 cDNA 第 1 链, 随后加入 DNA polymerase I、缓冲液和 RNase H 合成 cDNA 第 2 链, 用 QiaQuick PCR 试剂盒对 cDNA 双链进行纯化, 经过末端修复、加碱基 A、加测序接头等一系列步骤, 用琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 最后通过 PCR 扩增目的片段完成 cDNA 文库的构建。合成的 cDNA 样品由深圳华大基因研究院(BGI)进行测序, 测序平台为 Illumina HiSeq™ 2000, 每个样品 1 个 Line 的测序量。

1.4 原始数据处理

测序产生的原始图像数据通过 base calling 转换为序列数据(raw data)。利用固定脚本对 raw data 进行一系列的前处理, 过滤掉只含有测序接头(adapter)的 reads, 含有空白片段 N 的比例超过

10% 的 reads, 以及质量值 $Q \leq 5$ 碱基数目比例超过整个 read 50% 以上的低质量 reads, 获得可用于分析的数据 Clean reads。同时, 应用 Trinity 软件进行混合拼接, 将两个测序样本中的 clean reads 与玫烟色棒束孢转录组(待发表)进行比对, 去除虫体中含有的玫烟色棒束孢带来的物种序列污染, 得到非冗余的 Unigene。

1.5 Unigene 与参考序列的比对

将各样本拼接得到的 Unigene 用 SOAP 软件(Li *et al.*, 2009) 比对到小菜蛾基因组上(<http://iae.fafu.edu.cn/DBM/index.php>), 产生注释。

1.6 显著差异表达基因筛选

分别计算感菌和健康小菜蛾两个样本中所有基因的表达量, 对样本间的基因表达水平进行差异比较。基因表达量的计算方法使用 RPKM 法(reads per kb per million reads)(Mortazavi *et al.*, 2008), 其计算公式为:

$$RPKM = \frac{10^5 C}{NL/10^3}。$$

假设目标基因 A 的表达量为 $RPKM(A)$, 则 C 为唯一比对到该基因 A 上的 clean reads 的数目, N 为唯一比对到参考基因序列上的总的 clean reads 的数目, L 为目标基因 A 的总碱基数目。使用 edgeR (Robinson *et al.*, 2010) 进行差异分析。通过控制 FDR(false discovery rate)值来决定 P 值的阈值, 进行多重检验, FDR 不能超过 5%。因此, 以 $FDR < 0.001$ 和 $|\log_2 \text{Ratio}| (1 \text{ 作为阈值判断基因表达差异的显著性, 筛选出显著差异表达基因(differentially expressed unigenes, DEUs)})$ 。

1.7 GO 功能注释和 KEGG pathway 富集分析

将 DEUs 比对到 GO 数据库和 KEGG 数据库。利用 Blast2GO 对 DEUs 进行 GO 功能注释, 通过 WEGO(Ye *et al.*, 2006) 对 DEUs 在生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个部分的功能和作用方式进行 GO 分类。通过 MADIBA(Law *et al.*, 2008) 分析 DEUs 所处的代谢路径或信号传导途径。运用超几何检验的方法, 确定 GO 和 KEGG pathway 在 DEUs 中的 P 值, 当 $P < 0.05$, 则认为基因在特定 GO 或 pathway 中是显著富集的, 反之则不富集。

2 结果

2.1 测序结果分析

从健康和感菌小菜蛾转录组中分别获得了

12 565 677和12 599 166 个 raw reads(图 1)。除去含有接头的、含未知碱基和低质量的 reads,分别获得了12 315 210 和12 346 987 个 clean reads(表 1),对所得到的 clean reads,使用 reads 比对软件 SOAPaligner/soap2 将 clean reads 分别比对到小菜蛾基因组上。其中,达到完美匹配的 reads 分别为健康4 031 042 条,感菌3 969 192 条,分别有32.73%和32.15%的 reads 完美匹配到小菜蛾基因组数据中唯一的 unigene,各处理样品有约 50% 的 reads 能唯一匹配到小菜蛾基因组数据中的 unigene(允许有 2 bp 的错配)。

表 1 健康和感染玫烟色棒束孢的小菜蛾 RNA-seq 测序结果

Table 1 Statistics of RNA sequencing metrics from transcriptomes of <i>Plutella xylostella</i> larvae uninfected and infected by <i>Isaria fumosorosea</i>		
度量标准 Metric	健康小菜蛾 Uninfected	感菌小菜蛾 Infected
Reads 总数 Total reads	12 315 210	12 346 987
碱基对总数 Total base pairs	603 445 290	605 002 363
符合设定参数的 reads 总数 Total mapped reads	7 544 209 (61.26%)	7 523 304 (60.93%)
完美匹配 Perfect match	4 031 042 (32.73%)	3 969 192 (32.15%)
唯一匹配 Unique match	6 261 056 (50.84%)	6 236 958 (50.51%)

2.2 测序质量评估及基因覆盖度统计

对两个样本测序出来的 raw reads 进行数据处理(图 1),在健康和感菌小菜蛾样本中,只含有接头的序列分别占 raw reads 的 0.46% 和 0.51%,没有测出的序列在两个库中各占 0.03%,质量低的测序分别占 1.50% 和 1.47%,剩下可用于后续分析数据的 clean reads 分别占两个库 raw reads 的 98.01% 和 98.00%。基因测序覆盖度指每个基因被 reads 覆盖的百分比,其值等于在基因中唯一能比对到参考基因组上的 reads 的碱基数目与该参考基因的所有碱基数目的比值(unique mapping reads)。在健康和感菌小菜蛾两个样本中,基因覆盖度在 90% ~ 100% 之间的 reads 在每个样本中是最多的,分别有 2 383 和 2 518 条序列;在 80% ~ 90% 之间的分别有 1 375 和 1 535 条;覆盖度在 0 ~ 10% 之间的 reads 最少,分别为 1 023 和 972 条(图 1)。

2.3 显著差异表达基因筛选

从图 2 可以看出,健康和感菌小菜蛾之间共得到 15 089 个差异表达基因,其中显著差异表达 351 个($FDR \leq 0.001$ and $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$),上调表达基因 275 个,下调表达基因 76 个,上调 DEUs 数量是下调的 3 倍(图 2: A),与免疫相关的基因有 156 个。在这些差异表达基因中,表达量差异倍数达到

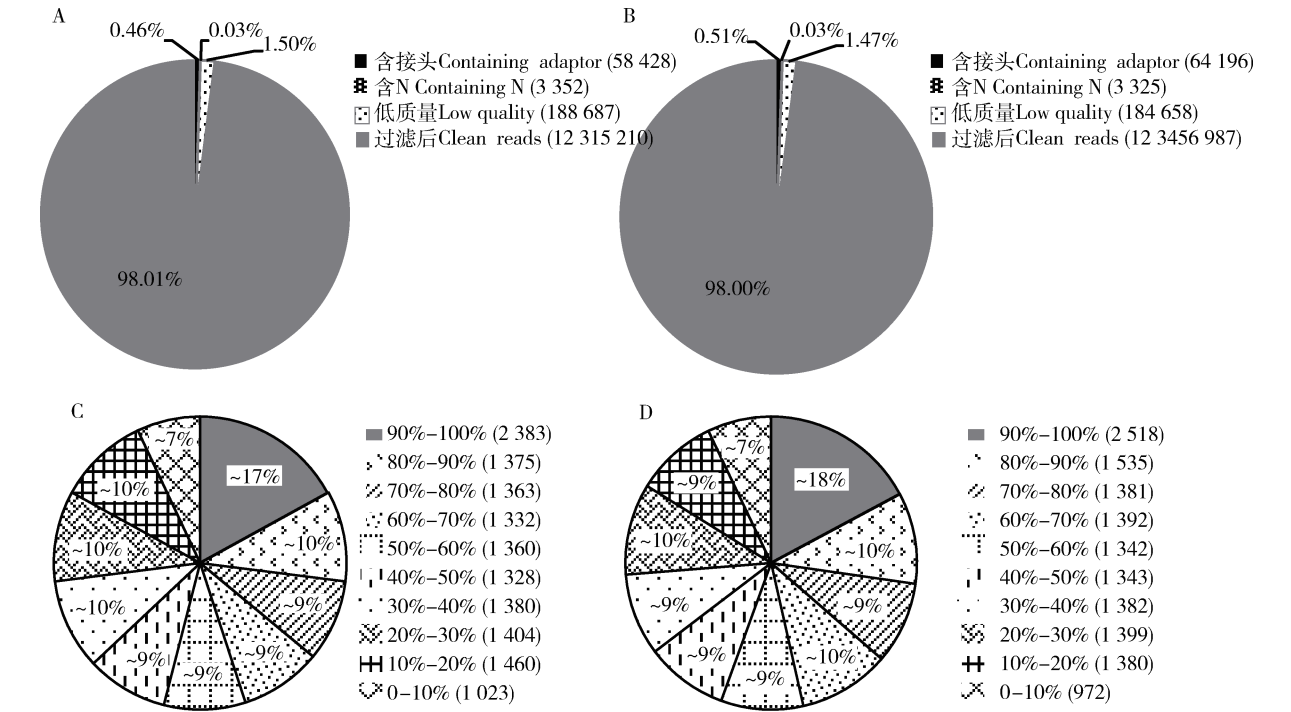


图 1 健康(A, C)和感染玫烟色棒束孢的(B, D)小菜蛾幼虫转录本基本参数
Fig. 1 Basic quantitative transcriptome parameters of transcriptomes of *Plutella xylostella* larvae uninfected (A, C) and infected (B, D) by *Isaria fumosorosea*
A, B: 测序质量评估图 Classification of raw reads; C, D: 基因覆盖度统计 Distribution of gene coverage.

结合 GO 数据库,将 DEUs 比对上的 3 个功能注释本体进行三级分类,得到若干个子集(表 2)。对感菌和健康小菜蛾间 DEUs 可能参与的基因功能进行聚类统计分析,发现 unigene 显著富集在细胞组分亚类的“胞外区域”(extracellular region)(GO: 0005576)以及分子功能亚类的“氧化还原酶活性”(oxidoreductase activity)(GO: 0016491)、“细菌细胞表面结合”(bacterial cell surface binding)(GO: 0051635)、“细胞表面结合”(cell surface binding)(GO: 0043498)等。在生物学过程亚类中,差异表达基因集中在:“应激反应”(response to stress)(GO: 0006950)、“防御反应”(defense response)(GO: 0006952)、“应激反应中对翻译的调控”(regulation of translation in response to stress)(GO: 0043555)、“应激反应中对翻译起始的调控”(regulation of translational initiation in response to stress)(GO: 0043558)、“细胞自我吞噬调控”(regulation of autophagy)(GO: 0010506)、“天然免

疫反应调控”(regulation of innate immune response)(GO: 0045088)、“免疫系统过程”(immune system process)(GO: 0002376)、“天然免疫反应”(innate immune response)(GO: 0045087)和“免疫反应”(immune response)(GO: 0006955)等一系列与免疫反应相关的功能,说明小菜蛾被玫烟色棒束孢侵染之后,体内产生了一系列的生理生化防御反应,主要涉及能量代谢、转录和翻译调控以及防御反应等方面。

2.5 差异表达基因 KEGG pathway 富集分析

将健康和感菌小菜蛾间显著差异表达基因 DEUs 映射到 KEGG 路径库里富集分析(表 3),结果显示,一共有 163 个 DEUs 比对到 153 个代谢通路(pathway)里,其中有 132 个 DEUs 显著富集在 13 条代谢通路中($Q < 0.05$),说明这些通路在真菌诱导下被显著调控。富集 DEUs 最多的通路为“A 型流感”(Influenza A)代谢通路(12 个上调和 8 个下调 DEUs)、“蛋白消化和吸收代谢途径”(protein digestion and absorption)(10 个上调和 8 个下调 DEUs)、

表 2 健康和感染玫烟色棒束孢的小菜蛾幼虫转录组中差异表达基因(P 值 < 1) GO 三级分类

Table 2 Significantly enriched GO term (level-3) (P -value < 1) in the transcriptomes of *Plutella xylostella* larvae infected and uninfected by *Isaria fumosorosea*

	GO 条目 GO term	差异表达基因数量 Number of DEUs
细胞组分 Cellular component		
胞外区域 Extracellular region		7
分子功能 Molecular function		
氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity		16
细菌细胞表面结合 Bacterial cell surface binding		3
细胞表面结合 Cell surface binding		3
肽链内切酶抑制剂活性 Endopeptidase inhibitor activity		2
肽酶抑制剂的活性 Peptidase inhibitor activity		2
肽链内切酶调节活性 Endopeptidase regulator activity		2
氧化还原酶活性, 作用于匹配的供体, 与匹配供体发生氧化反应, 引起氧分子还原成两个水分子 Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water		2
肽酶调节活性 Peptidase regulator activity		2
生物学过程 Biological process		
应激反应 Response to stress		17
翻译起始的 eIF2 α 磷酸化调节 Regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation		2
防御反应 Defense response		6
应激反应中对翻译的调控 Regulation of translation in response to stress		2
应激反应中对翻译起始的调控 Regulation of translational initiation in response to stress		2
细胞自我吞噬调控 Regulation of autophagy		3
天然免疫反应调控 Regulation of innate immune response		3
免疫系统过程 Immune system process		7
天然免疫反应 Innate immune response		4
细胞因子生成调控 Regulation of cytokine production		2
免疫反应 Immune response		5

表 3 健康和感染玫烟色棒束孢的小菜蛾幼虫转录组中差异表达基因 (Q 值 <0.05) 的 KEGG pathway 富集分析

Table 3 Significantly enriched KEGG pathways of differentially expressed unigenes (DEUs) (Q-value <0.05) in the transcriptomes of *Plutella xylostella* larvae infected and uninfected by *Isaria fumosorosea*

通路 ID Pathway ID	通路 Pathway	差异表达基因数量 Number of DEUs	Q 值 Q-value
ko05164	流感 A Influenza A	20	3.31e-06
ko04974	蛋白消化和吸收 Protein digestion and absorption	18	1.41e-05
ko04972	胰腺分泌 Pancreatic secretion	21	1.50e-05
ko00965	甜菜红色素生物合成 Betalain biosynthesis	5	4.62e-05
ko00073	角质、软木脂和蜡质的生物合成 Cutin, suberine and wax biosynthesis	6	1.75e-04
ko04146	过氧化物酶体 Peroxisome	12	8.22e-04
ko00950	异喹啉类生物碱的生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	5	9.31e-04
ko04080	神经活性的配体-受体互作 Neuroactive ligand-receptor interaction	18	1.48e-03
ko00740	核黄素代谢 Riboflavin metabolism	4	2.27e-03
ko04610	补体和凝血级联反应 Complement and coagulation cascades	6	7.21e-03
ko05014	肌萎缩 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	6	7.21e-03
ko00630	乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5	1.71e-02
ko00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	6	2.60e-02

“胰汁分泌”(pancreatic secretion)(13 个上调和 8 个下调 DEUs)。这 3 个通路所涉及到的基因分别占总注释基因的 12.27%, 11.04% 和 12.88%, 并且上调表达 DEUs 的数量多于下调表达的数量。一些 DEUs 同时参与了多个代谢通路, 比如高表达上调基因 CCG001601.1 ($\log_2\text{Ratio} = 9.1$), 编码着胰岛素(trypsin), 同时参与了 3 个代谢通路, 与虫体内能量代谢调控密切相关。此外, 富集 DEUs 较多的通路还有“过氧化物酶体”(peroxisome)、“神经活性的配体-受体相互作用”(neuroactive ligand-receptor interaction)等, 涉及传染性疾病、能量代谢、生理防御和神经性疾病等方面。

3 讨论

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中最大的一个类群, 其作为害虫生物防治的重要组成部分, 在持续控制害虫、保护生态平衡方面具有不可替代的作用。尽管真菌杀虫剂安全、无环境污染, 但与化学农药相比, 却存在着杀虫速率缓慢的弱点(王滨等, 2001; Ren *et al.*, 2011)。昆虫病原真菌在寄主表皮定殖和侵入昆虫血腔增殖的两个时期, 是昆虫免疫识别与防御、病原真菌对抗寄主免疫反应的关键时期, 昆虫与病原真菌之间识别与反识别、免疫与抗免疫的动态互作关系影响着真菌的作用速率。

球孢白僵菌和金龟子绿僵菌感染昆虫时, 伴随着白僵菌素(beauvericin)和破坏素(destruxin)等毒素的作用(宋肖玲和李国霞, 2002)。目前, 玫烟色

棒束孢能否分泌毒素还不清楚, 这株玫烟色棒束孢 EBCL 03011 致病速度之快的原因仍不得而知(吕利华等, 2007), 其对寄主昆虫的致病机制有可能与依靠毒素致死宿主的病原真菌不同, 推测小菜蛾对玫烟色棒束孢的免疫方式有其独特性。本研究通过 RNA-seq 技术测定了小菜蛾 4 龄幼虫被玫烟色棒束孢感染 12 h 后的表达谱, 与健康小菜蛾表达谱数据比对, 在获得的差异表达基因中, 挖掘了一批与玫烟色棒束孢感染直接或潜在相关的小菜蛾免疫应答基因与相关调控网路。在感菌和健康小菜蛾转录组这两个表达谱里, 共得到 15 089 个差异表达基因, 其中, 显著差异表达 351 个, 上调表达基因 275 个, 下调表达基因 76 个, 与免疫潜在相关的基因有 156 个; GO 富集分析有 102 个差异基因分布到 46 个 GO term 里, KEGG pathway 富集分析结果显示有 163 个差异基因分布到 153 个代谢通路里, 这些基因中, 包含着大量潜在的与免疫调控相关的基因。其中有与病原菌识别相关的 1 个 β -1, 3-葡聚糖识别蛋白(β GRP)(CCG009703.1)、1 个模式识别受体-革兰氏阴性菌结合蛋白(GNBP)(CCG009706.1)和 4 个受体-肽聚糖识别蛋白(PGRP)(CCG015207.1, CCG004942.1, CCG008494.1 和 CCG001311.2)经诱导显著上调表达。抗菌肽基因 *Drosomycin* 未被显著诱导或抑制, 可能与小菜蛾对真菌免疫特异性有关, 也可能与取样时间点未诱导这些基因表达有关。已有报道病原真菌可诱导 Toll 信号通路, 经模式识别受体识别后, 诱导丝氨酸蛋白酶级联反应, 进而激活 Spaetzle 配体产生构象变化以结合 Toll 受体

(Bischoff *et al.*, 2004)。本研究 Toll 信号途径中有 3 个 Toll 受体 (CCG003668.1, CCG001789.1 和 CCG007264.1) 被诱导显著上调表达, Imd 途径的一些基因也被不同程度地诱导表达, 两种信号通路间并非相互孤立 (Kaneko and Silverman, 2005), 感菌虫体为了维持机体的生理平衡, Imd 和 Toll 通路上的基因被激活, 参与抗菌反应。

此外, 昆虫经病原真菌诱导后, 天然免疫系统中还会出现类似抗真菌蛋白的分泌和新蛋白的产生 (Wang *et al.*, 2007)。昆虫的储存蛋白、转铁蛋白、热激蛋白、核糖体相关膜蛋白、过氧化氢酶、NADH 脱氢酶、谷胱甘肽 S-转移酶等也是潜在的免疫应答相关因子 (Vierstraete *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2011; 党向利等, 2012)。我们的测序结果中出现了一些参与能量代谢、核酸及蛋白代谢和加工、胁迫及解毒等过程的基因, 其作用具有网络性的特点, 不同基因之间通过相互协同或相互制约, 构成了复杂的免疫调节网络。本研究获得的表达谱数据库, 为探讨小菜蛾与玫烟色棒束孢间的互作提供了大量的免疫候选基因, 关于这些差异表达基因的功能和参与的途径及其在小菜蛾对抗玫烟色棒束孢感染时免疫应答作用, 还需要今后进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Baek JH, Kim JI, Lee DW, Chung BK, Miyata T, Lee SH, 2005. Identification and characterization of *acel*-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 81(3): 164–175.
- Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J, 2004. Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.*, 5(11): 1175–1180.
- Chen WW, Feng MG, 1999. Current status in basic and applied research on the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Natural Enemies of Insects*, 21(3): 140–144. [陈巍巍, 冯明光, 1999. 玫烟色拟青霉的研究与应用现状. 昆虫天敌, 21(3): 140–144]
- Dang XL, Chen GJ, Li XL, Liu YG, Jin YW, Yi HY, Lü YB, Chai YQ, 2012. Construction of suppression subtractive hybridization library of *Plutella xylostella* immunized by *Paecilomyces cicadae* and analysis of immune-related genes. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(1): 32–40. [党向利, 陈官菊, 厉晓腊, 刘又高, 金铁伟, 易辉玉, 吕要斌, 柴一秋, 2012. 蝉拟青霉感染小菜蛾幼虫 SSH 文库的构建及免疫相关基因分析. 中国生物防治, 28(1): 32–40]
- Heckel DG, Gahan LJ, Liu YB, Tabashnik BE, 1999. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(15): 8373–8377.
- Hou CX, Qin GX, Liu T, Mei XL, Zhang R, Zhao P, Shen ZY, Guo XJ, 2011. Differential gene expression in silkworm in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene*, 484(1–2): 35–41.
- Kaneko T, Silverman N, 2005. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell. Microbiol.*, 7(4): 461–469.
- Law PJ, Claudel-Renard C, Joubert F, Louw AI, Berger DK, 2008. MADIBA: a web server toolkit for biological interpretation of *Plasmodium* and plant gene clusters. *BMC Genomics*, 9: 105.
- Lei YY, He YR, Lü LH, 2011. Physiological defense responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) larvae infected by entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 887–893. [雷妍圆, 何余容, 吕利华, 2011. 小菜蛾血淋巴对玫烟色棒束孢入侵的生理防御反应. 昆虫学报, 54(8): 887–893]
- Lei ZR, Wu SY, Wang HH, 2016. Progresses in biological control of vegetable insect pests in China. *Plant Protection*, 42(1): 1–6. [雷仲仁, 吴圣勇, 王海鸿, 2016. 我国蔬菜害虫生物防治研究进展. 植物保护, 42(1): 1–6]
- Li R, Yu C, Li Y, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K, Wang J, 2009. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*, 25(15): 1966–1967.
- Lü LH, He YR, Wu YJ, Feng X, Chen HY, 2007. The time-dose-mortality model of a *Paecilomyces fumosoroseus* isolate on the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 567–573. [吕利华, 何余容, 武亚敬, 冯夏, 陈焕瑜, 2007. 玫烟色拟青霉对小菜蛾致病力的时间-剂量-死亡率模型模拟. 昆虫学报, 50(6): 567–573]
- Magalhaes T, Leandro DC, Ayres CFJ, 2010. Knock-down of REL2, but not defensin A, augments *Aedes aegypti* susceptibility to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Acta Trop.*, 113(2): 167–173.
- Marjorie AH, Raghuwinder S, Michael ER, 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.*, 93(1): 24–32.
- Meyer JM, Hoy MA, Boucias DG, 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *J. Invertebr. Pathol.*, 99(1): 96–102.
- Milner RJ, 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga*, 42(1/2): 227–239.
- Mohan M, Gujar GT, 2003. Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Prot.*, 22(3): 495–504.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B, 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, 5(7): 621–628.
- Qiu DW, 2015. Analysis of the development situation and trends of biological pesticides in China. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(5): 679–684. [邱德文, 2015. 生物农药的发展现状与趋势分析. 中国生物防治学报, 31(5): 679–684]
- Ren QY, Sun M, Guan GQ, Li YQ, Liu ZJ, Liu AH, Ma ML, Niu QL,

- Liu JL, Yin H, Luo JX, 2011. Biological control of engorged female *Haemaphysalis qinghaiensis* (Acari: Ixodidae) ticks with different Chinese isolates of *Beauveria bassiana*. *Parasitol. Res.*, 109(4): 1059 – 1064.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK, 2010. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139 – 140.
- Song XL, Li GX, 2002. Advance of actional mechanism for the toxin of entomopathogenic fungi to insects. *Acta Microbiologica Sinica*, 42(3): 388 – 392. [宋肖玲, 李国霞, 2002. 昆虫病原真菌毒素对昆虫的作用机制研究进展. *微生物学报*, 42(3): 388 – 392]
- Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 275 – 301.
- Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Bergh GVD, Arckens L, Loof AD, Schoofs L, 2004. A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(2): 470 – 475.
- Wang B, Li ZZ, Fan MZ, Huang B, 2001. Advances of research on genes of entomopathogenic fungi. *Mycosystema*, 20(3): 430 – 434. [王滨, 李增智, 樊美珍, 黄勃, 2001. 昆虫病原真菌基因研究进展. *菌物系统*, 20(3): 430 – 434]
- Wang CT, Cao YQ, Wang ZK, Yin YP, Peng GX, Li ZL, Zhao H, Xia YX, 2007. Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96(3): 230 – 236.
- Wang Q, Liu Y, He HJ, Zhao XF, Wang JX, 2010. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC Immunol.*, 11: 9.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10(1): 57 – 63.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S, 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control*, 17(3): 203 – 217.
- Ye J, Fang L, Zheng HK, Zhang Y, Chen J, Zhang ZJ, Wang J, Li ST, Li RQ, Bolund L, Wang J, 2006. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res.*, 34(Suppl. 2): W293 – W297.

(责任编辑: 袁德成)